

NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO HIALURÓNICO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al desarrollo de un sistema nanoparticular para la
5 administración de macromoléculas activas, tanto de carácter hidrofílico o hidrofóbico, una
composición que comprende las mismas y un procedimiento para su elaboración. Estas
nanopartículas comprenden ácido hialurónico en forma de sal, preferentemente la sal sódica de
dicho polímero, y un polímero cargado positivamente, preferentemente quitosano. Se incorpora a
la formulación una sal polianiónica, de manera preferida seleccionada de entre el grupo de los
10 fosfatos. Estas nanopartículas pueden ser utilizadas para la administración de ingredientes
activos por diferentes vías al organismo. Los ingredientes activos pueden ser moléculas con
propiedades terapéuticas, vacunas o ingredientes cosméticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La administración de principios activos presenta numerosas dificultades, dependientes
tanto de la vía de administración utilizada como de las características fisicoquímicas y
morfológicas de las moléculas. Es conocido que los mayores inconvenientes se presentan a la
hora de administrar moléculas activas inestables, hidrofílicas y de gran tamaño. Por una parte, el
acceso de las macromoléculas hidrofílicas al interior del organismo se ve limitado por la baja
20 permeabilidad que presentan las barreras biológicas. Asimismo, éstas son susceptibles de ser
degradadas debido a los diferentes mecanismos de defensa que presentan tanto el organismo
humano como animal. Estas dificultades han de ser solventadas para conseguir el acceso de la
molécula activa a la diana terapéutica y, así, una terapia efectiva.

Ha sido demostrado que la incorporación de macromoléculas en sistemas de tamaño
25 nanométrico facilita su penetración a través de las barreras epiteliales y las protege de ser
degradadas. Así pues, el diseño de sistemas nanoparticulares capaces de interaccionar con
dichas barreras se presenta como una estrategia prometedora para conseguir la penetración de
principios activos a través de mucosas.

Es también conocido que la capacidad de estos sistemas para atravesar las barreras
30 externas y acceder al interior del organismo depende tanto de su tamaño como de su
composición. Partículas de pequeño tamaño aumentarán el grado de transporte respecto a las de
un mayor tamaño; las nanopartículas, de diámetro inferior a 1 μm , responden a este criterio. Si

se elaboran a partir de polímeros de origen natural, biocompatibles y biodegradables, incrementan las posibilidades de que éstas sean transportadas a través de las mucosas del organismo de forma natural, mediante mecanismos de transporte conocidos y sin alterar la fisiología de los epitelios. Otra característica de los sistemas nanoparticulares es que permiten la liberación controlada de las moléculas activas que incorporan y su orientación hacia los tejidos diana.

El ácido hialurónico es un polímero de origen natural. Más concretamente, es un glicosaminoglicano presente en la matriz extracelular de tejidos conectivos, como son el subcutáneo y el cartílago, así como en el cuerpo vítreo del globo ocular y en el fluido sinovial de las cavidades articulares. Se trata de un polímero para el cual existen receptores, siendo predominantes CD44 y RHAMM, los cuales se encuentran localizados a nivel de la superficie celular en prácticamente todas las células del organismo, a excepción de los glóbulos rojos. La interacción del ácido hialurónico con estos receptores permite la regulación de determinados procesos fisiológicos como son la movilidad y proliferación celular. Debido a estas propiedades, el ácido hialurónico es utilizado en terapéutica, ya que ejerce un papel importante en procesos como morfogénesis y desarrollo embrionario, cáncer e inflamación. Además, debido a las citadas propiedades, el ácido hialurónico es utilizado para la promover la cicatrización de epitelios. Prueba de esta actividad biológica son numerosos trabajos en los que se incluye al ácido hialurónico como biomolécula activa, pudiendo mencionar los descritos por Sand et al., Acta Ophthalmol. 67, 1989, 181-183, donde se aplica ácido hialurónico en el tratamiento de keratoconjuntivitis sicca y Nishida et al., Exp. Eye Res. 53, 1991, 753-758, donde se aplica como agente cicatrizante a nivel corneal.

El ácido hialurónico y sus derivados, bajo diferentes formas de presentación, han sido objeto de numerosas patentes. En algunos de estos documentos el ácido hialurónico se presenta como molécula activa y en otras como biomaterial —excipiente— empleado en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Su interés en esta línea se debe a que es un polímero biodegradable, biocompatible, no inmunogénico y que presenta propiedades mucoadhesivas.

De entre las patentes en las que se cita el ácido hialurónico como ejemplo de molécula activa cabe destacar los siguientes:

El documento WO9606622 reivindica la utilización de ácido hialurónico y derivados, solo o en combinación con otro agente terapéutico, para modular la actividad celular de aquellos tejidos y células que en su superficie expresan receptores para el ácido hialurónico, y así tratar o prevenir procesos inflamatorios, fibrosis, o oncogénesis.

La patente US6383478, protege un sistema de liberación consistente en micropartículas, nanopartícula o films en los que se incorpora el ácido hialurónico como posible molécula activa para promover la angiogénesis. El film polimérico o el vehículo particular están formados por al menos dos polímeros aniónicos (entre los que no figura el ácido hialurónico), un polímero catiónico (entre los que no figura ni el quitosano ni la gelatina ni el colágeno) y un catión de bajo peso molecular.

El documento WO0101964 se refiere a la formación de un complejo iónico, entre polímeros hidrofílicos de cargas opuestas, que posteriormente será precipitado dando lugar a la formación de partículas, en un rango de tamaño entre 5nm-1mm. El polímero catiónico puede ser un polímero con carga positiva, como por ejemplo el quitosano. Como polímeros aniónicos se mencionan sulfato de dextrano y otros. La precipitación tiene lugar al producirse la desolvatación del complejo, mediante la adición de agentes desolvatantes, en este caso sulfato de zinc. Estos complejos particulados incorporan una biomolécula que previamente es complejada con uno de los polímeros hidrofílicos que forman parte del vehículo. El ácido hialurónico puede ser una de las biomoléculas incorporadas, ya que la descripción incluye el uso de polisacáridos. Por tanto, se trata de un sistema en el que la molécula activa (ácido hialurónico) es complejada con un polímero catiónico (por ejemplo el quitosano) y este complejo se hace interaccionar con otro polímero aniónico (sulfato de dextrano) y el conjunto se precipita por adición de sulfato de zinc.

El documento WO9704747 describe la obtención de nanopartículas a partir de polímeros principalmente hidrofóbicos, estando dichas nanopartículas recubiertas por un agente adhesivo. Como ejemplo de molécula activa se cita a un polisacárido, que podría ser el ácido hialurónico, aunque no se menciona explícitamente. Aunque dicha patente señala el quitosano como posible material para formar las nanopartículas, todos los ejemplos se refieren a la utilización de polímeros hidrofóbicos, siendo necesarios disolventes orgánicos para formar las nanopartículas.

El grupo de patentes en las que el ácido hialurónico es empleado como excipiente para el desarrollo de sistemas de liberación de principios activos, es también muy amplio. Dichos sistemas pueden presentarse en forma de simples complejos, hidrogeles, microsferas y nanopartículas.

Entre los numerosos sistemas que incorporan ácido hialurónico o derivados del mismo en su composición, cabe destacar los documentos siguientes:

El documento EP0544259 se refiere a la obtención de un **complejo** de ácido hialurónico con un material de elevado peso molecular con grupos amino como puede ser el quitosano. Este complejo se presenta en diferentes formas adoptando la del recipiente en que es obtenido.

En el documento WO0182724 se reivindica una composición que es un simple **complejo** particulado formado un aminopolisacárido cargado positivamente, pudiendo este ser quitosano, y un polisacárido dotado de carga negativa, mencionando el ácido hialurónico. Este complejo particulado se forma según un proceso de precipitación no controlada. Es decir, no se hace uso de ningún agente reticulante que permita controlar la formación de las partículas, por lo que las partículas resultantes son normalmente irregulares y altamente dispersas.

Además, existen una serie de patentes que protegen la obtención de **hidrogeles** con arreglo a diferentes procedimientos y composiciones. Entre estas cabe destacar:

US4582865 protege la obtención de hidrogeles de ácido hialurónico o derivados, sólo o en combinación con otros polímeros hidrofílicos como celulosa, colágeno, xantano, carboximetilcelulosa, etc., obtenidos al hacerlos reaccionar con una divinilsulfona

WO0128602 describe la obtención de una formulación inyectable, en forma de gel o pasta, para la liberación de proteínas osteogénicas que comprende derivados benciléster de ácido hialurónico, una proteína osteogénica y trifosfato cálcico como componente mineral.

El documento WO9009401 se refiere a hidrogeles de ácido hialurónico o derivados, obtenidos por reticulación del polímero tras hacerlo reaccionar con un derivado de ácido fosfórico, donde se establecen puentes de unión éster fosfato. Estos hidrogeles resultan útiles para su aplicación como implantes depósito de principios activo, en forma de films, tubos, etc.

El documento WO0230990 describe la producción de un derivado amida reticulado del ácido hialurónico, basado en una reacción de éste con un polímero catiónico con dos o más grupos amino (entre los cuales se encuentra el quitosano). Para llevar a cabo esta reacción química se necesita de un agente activador de grupos carboxílicos, utilizando una carbodiimida. Este derivado amida del ácido hialurónico se puede presentar en forma de geles, membranas, beads...

Asimismo, existen una serie de documentos que hacen referencia a la obtención de **partículas (micropartículas o nanopartículas)** en cuya composición entra el ácido hialurónico. Conviene hacer la distinción entre las microsferas o micropartículas cuyo tamaño de partícula está entre 1-100µm y las nanosferas o nanopartículas cuyo tamaño es inferior a una micra. Aunque existen patentes que reivindican intervalos de tamaño de partícula muy amplios

(desde nano a micro), lo cierto es que muchas de las tecnologías aplicables a la obtención de micropartículas no permiten la formación de nanopartículas.

Así, la patente **WO 89/03207** y el artículo de Benedetti et al., *Journal of Controlled Release* 13, 33-41 (1990) presentan la obtención de microsferas de ácido hialurónico según el método de evaporación del disolvente. Más recientemente, el documento US6066340 se refiere a la posibilidad de obtener dichas microsferas haciendo uso de técnicas de extracción del disolvente. No obstante, dichos documentos no mencionan la obtención de nanopartículas ya que no es posible conseguir la formación de nanopartículas según las técnicas referidas en los mismos.

Además, se ha propuesto la combinación de ácido hialurónico y quitosano en un sistema microparticular a fin de combinar el efecto mucoadhesivo del ácido hialurónico con el efecto promotor de la absorción del quitosano. El valor de esta combinación microparticular se refleja en los trabajos de *Lim et al., J. Contr. Rel.* 66, 2000, 281-292 y *Lim et al., Int. J. Pharm.* 23, 2002, 73-82. Al igual que en el documento precedente, estas micropartículas han sido preparadas por la técnica de emulsión-evaporación del solvente.

El documento **US2001053359** propone la combinación, para administración nasal, de un antiviral y un material bioadhesivo, presentándose en forma una solución o bien de microsferas compuestas de diferentes materiales, entre ellos gelatina, quitosano o ácido hialurónico, pero no sus mezclas. Las micropartículas son obtenidas por técnicas clásicas como la atomización y emulsión/evaporación del disolvente. Una vez obtenidas, las micropartículas son endurecidas por procedimientos convencionales de reticulación química (dialdehidos y dicetonas).

El documento **US2002197328** se refiere igualmente a micropartículas, preparadas a partir del ácido hialurónico, por atomización. La diferencia con respecto a las anteriores es que se protegen las micropartículas de ácido hialurónico de alto peso molecular (superior a 1,000,000 daltons). Aunque en las reivindicaciones se señala la obtención de partículas de tamaño inferior a 1 micra, lo cierto es el que procedimiento de atomización con el que se obtienen las partículas referidas, no permite la obtención de nanopartículas.

Más recientemente, el documento **US20030026844** ha ido encaminado a proteger partículas porosas, con un tamaño entre 10nm-500µm, que presentan grupos iónicos funcionales en su superficie. Estas partículas están constituidas por uno o más biopolímeros (entre los cuales se encuentran determinados polisacáridos como ácido hialurónico, quitosano). Según este documento, los grupos iónicos se consiguen gracias a la incorporación imprescindible de agentes tensoactivos ionizables. Para la formación de estas partículas describen diferentes

métodos, como extracción o evaporación del solvente, atomización, coacervación y uso de fluidos supercríticos. A pesar de que en las reivindicaciones se señala la obtención de partículas de tamaño inferior a 1 micra, lo cierto es el que los procedimientos descritos en dicho documento no permiten la obtención de nanopartículas.

5 El documento WO-A-99/47130 se refiere a nanopartículas que presentan un complejo polielectrolítico, a partir de un polication (que puede ser quitosano) y un polianión, así como al menos un ingrediente bioactivo, siendo las nanopartículas obtenibles tratando adicionalmente el complejo de polielectrolito durante o después de su formación con al menos un agente reticulante (glioxal, TSTU o EDAP). Como polianión se indica el sulfato de polixilano.

10 El documento US6132750 se refiere a la obtención de partículas de pequeño tamaño (micro y nanopartículas) que en su superficie contienen al menos una proteína (colágeno, gelatina) y un polisacárido (quitosano o glicosaminoglicanos, entre otros). Se forman por reticulación interfacial con un agente acilante polifuncional que forma enlaces amida o éster, y opcionalmente enlaces anhídridos. Se pretende que en su superficie queden grupos
15 libres capaces de reaccionar con iones metálicos.

El documento WO9918934 se refiere a un nanopartículas que constan de un núcleo formado por un polímero cargado positiva o negativamente y una cubierta formada por la combinación de ambos. Durante la producción de las mismas necesitan la aplicación de ultrasonidos. La estabilización de las partículas se realiza por reacción de las mismas con un
20 agente reticulante (un polialdehído de dextrano, un polímero fotoreticulante o una glutamil transferasa).

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden ácido hialurónico en
25 forma de sal, preferentemente la sal sódica de dicho polímero, y un polímero de origen natural cargado positivamente, preferentemente quitosano, de manera que interaccione electrostáticamente con la forma desprotonada del ácido hialurónico. Se incorpora a la formulación una sal polianiónica capaz de reticular iónicamente la molécula catiónica causando su gelificación, de manera preferida seleccionada de entre el grupo de los fosfatos.

30 Una combinación entre ácido hialurónico y quitosano, en forma nanoparticular, conduce a la obtención de un sistema con elevado potencial en el campo de la terapéutica. Por otra parte, es conocida la posibilidad que existe de obtener complejos iónicos a partir de ambos polímeros, al presentar cargas opuestas. También es conocida la diferencia existente entre complejos y

nanopartículas, ya que la ventaja de las nanopartículas con respecto a los complejos es un mayor control en cuanto a su composición y tamaño, así como una mayor estabilidad. Con el objeto de proporcionar estabilidad a los sistemas, se ha procedido a la reticulación de los mismos mediante la adición de sustancias que forman enlaces químicos entre los compuestos.

- 5 Debido a todo lo mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a la combinación de dos polímeros, ácido hialurónico y quitosano, pudiendo sustituirse el quitosano por otros polímeros de origen natural cargados positivamente, como colágeno o gelatina, para la obtención de un sistema nanoparticular. Asimismo se ha encontrado un procedimiento de elaboración de nanopartículas que da lugar a la formación de las mismas de manera controlada y
- 10 que prescinde del uso de solventes orgánicos así como de condiciones extremas. Por tanto, se preserva así la integridad de las macromoléculas incorporadas al sistema, susceptibles de ser degradadas. Para lograr la formación de nanopartículas en un rango de tamaños deseado, se recurre a la adición de una sal polianiónica que conducirá a la gelificación del polímero de carga positiva, simultáneamente con la interacción iónica con el ácido hialurónico. Se trata, por tanto,
- 15 de un proceso de gelificación/interacción iónica, que ocurre de manera controlada y proporcionará estabilidad al sistema, sin que exista la necesidad de creación de enlaces covalentes entre los componentes. Estas nanopartículas presentarán ventajas respecto a otros sistemas de mayor tamaño (micropartículas, pellets, vedas, films, esponjas...) en cuanto a sus aplicaciones biológicas. De hecho, se sabe que la interacción de un sistema de liberación de
- 20 fármacos con una superficie biológica está altamente condicionada por su tamaño. Así, las nanopartículas son capaces de atravesar epitelios y mucosas actuando como sistemas de transporte de fármacos, mientras que las micropartículas no tienen esa capacidad. Igualmente, la biodistribución de estos sistemas está altamente condicionado por el tamaño. El conocimiento generado en los últimos años en el mundo de los sistemas coloidales de liberación de fármacos
- 25 ha permitido fijar una frontera claramente definida entre los sistemas coloidales (inferiores a una micra) y los sistemas microparticulares.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 30 La presente invención describe la elaboración de nanopartículas constituidas a partir de una sal del ácido hialurónico y de otro polímero hidrofílico capaz de interaccionar con el mencionado glicosaminoglicano, siendo mediada dicha interacción por una sal polianiónica capaz de reticular el sistema mediante el establecimiento de interacciones electrostáticas. El método de obtención de las partículas es un método sencillo que evita el uso de solventes orgánicos así como de condiciones drásticas. Además, tampoco es necesario llevar a cabo

ningún tipo de reacción química para la obtención de las mismas, ya que según se ha indicado el procedimiento de reticulación es iónico.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para elaborar nanopartículas de ácido hialurónico con un diámetro inferior a $1\mu\text{m}$, que incorporan un
5 ingrediente activo, independientemente de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica del mismo. Este procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una disolución acuosa de una sal de ácido hialurónico, de forma preferida en una concentración de entre 0,50 y 5 mg/mL;
- b) preparar una disolución acuosa de un polímero catiónico, de forma preferida en una
10 concentración de entre 0,5 y 5 mg/mL;
- c) adicionar una sal polianiónica a la disolución de la sal de ácido hialurónico, de forma preferida en una concentración de 0,25 y 1,00 mg/mL,
- d) mezclar bajo agitación las disoluciones resultantes de las etapas b) y c), obteniéndose espontáneamente las nanopartículas.

15 El ingrediente activo o los ingredientes activos son disueltos en una de las disoluciones a), b) o c) o bien en la suspensión de nanopartículas obtenida en la etapa d) para ser adsorbido sobre las nanopartículas.

Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere a nanopartículas obtenidas según el procedimiento anterior, con unas características determinadas en cuanto a su
20 composición, propiedades y morfología, comprendiendo ácido hialurónico, un polímero cargado positivamente, una sal polianiónica y una macromolécula.

Según un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende las nanopartículas anteriores, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, respectivamente.

25 Según una realización preferida, la sal del ácido hialurónico es la sal sódica del mismo. De forma preferente, el polímero cargado positivamente será el quitosano, pudiendo utilizar también colágeno o gelatina.

También de forma preferente, la sal polianiónica será seleccionada de entre el grupo de los fosfatos, tomando como modelo el tripolifosfato sódico debido al elevado número
30 de cargas negativas que presenta en su estructura.

La formación de las partículas se produce al mezclar volúmenes de las soluciones mencionadas en diferentes proporciones. De este modo, las nanopartículas tendrán una

proporción relativa de los diferentes ingredientes ácido hialurónico:polímero positivo:sal aniónica que podrá variar entre 1:0,5:0,1 y 1:10:2, y, de forma preferida, entre 1:1:0,15 y 1:10:1,5.

5 El procedimiento de elaboración de las partículas de ácido hialurónico puede incluir una etapa adicional de liofilización, con el fin de preservarlas durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales. En forma liofilizada, las nanopartículas pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo, y ser fácilmente regeneradas, en caso necesario, simplemente añadiendo un volumen de agua óptimo. Por otra parte, el grado de reticulación de las nanopartículas aumenta con este proceso, ya que tiene lugar una
10 aproximación entre las cadenas poliméricas, lo que facilita que aumente el grado de entrecruzamiento polimérico, así como que se potencie el efecto del polianión como agente reticulante.

Para la liofilización de las partículas únicamente es necesaria la adición de pequeñas cantidades de azúcares, ya que el ácido hialurónico ejerce un efecto como crioprotector.

15 De acuerdo con esta etapa adicional, la presente invención se refiere también a nanopartículas de ácido hialurónico y un polímero positivo bajo forma de liofilizado, y a una composición farmacéutica o cosmética que las incluya, así como al menos un excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable.

20 Las nanopartículas aquí descritas presentan una estabilidad adecuada tanto en suspensión como bajo forma de liofilizado, por lo que pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo. Por otra parte, también ha sido estudiada su estabilidad en determinados fluidos biológicos lo cual garantiza que tras su administración a organismos, humano o animal, permanecerán bajo forma nanoparticular.

25 Por otra parte, las nanopartículas que comprenden ácido hialurónico en su composición han demostrado poseer excelentes propiedades de mucoadhesividad debido a su capacidad de interacción con la mucina (proteína presente en el moco), lo cual las convierte en sistemas de gran utilidad como sistemas farmacéuticos y también cosméticos. Pueden ser administradas por diferentes vías, y entre ellas resulta de elevado interés la administración a través de mucosas, así como también su administración por inyección intra-articular.

30 El ingrediente activo a incorporar en las nanopartículas que comprenden ácido hialurónico será aquel con propiedades farmacoterapéuticas adecuadas de acuerdo con la aplicación terapéutica a la cual sea destinada la formulación. El efecto sobre el organismo

humano o animal de las macromoléculas incorporadas tendrá por objeto curar, minimizar o prevenir una enfermedad, tras ser administradas.

Según la presente invención, las nanopartículas de ácido hialurónico y un polímero catiónico, como el quitosano, resultan adecuadas para incorporar macromoléculas independientemente de las características de solubilidad de las mismas. La capacidad de asociación dependerá de la macromolécula incorporada, pero en términos generales resulta elevada tanto para macromoléculas hidrofílicas como para aquellas de marcado carácter hidrofóbico. El ingrediente activo podrá ser un fármaco, una vitamina, una vacuna, etc., o un agente cosmético.

La macromolécula destinada a ser incorporada en las nanopartículas se disolverá previamente en una de las dos disoluciones acuosas que se emplean en la producción de las mismas. En el caso de macromoléculas de carácter lipofílico, se ha introducido una variante en la técnica de producción según la cual el ingrediente activo es disuelto en primer lugar en un pequeño volumen de una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible con agua, de manera preferida acetonitrilo, de forma preferida en una proporción aproximada de 1:1, el cual seguidamente se adicionará a una de las disoluciones acuosas mencionadas con anterioridad, de forma que la concentración en peso del disolvente orgánico en la disolución final sea siempre menor al 10 %.

Cabe la posibilidad de que las nanopartículas descritas en la presente invención incorporen más de una macromolécula, que podrán estar disueltas en la misma disolución o en ambas por separado, dependiendo esto de la naturaleza de las macromoléculas a incorporar evitando que exista ningún tipo de interacción, bien sea química o física, entre ellas.

Las nanopartículas de ácido hialurónico presentan un diámetro medio inferior a $1\mu\text{m}$, respondiendo por tanto a la definición de nanopartículas, sistema coloidal constituido a base de polímeros con un tamaño inferior a $1\mu\text{m}$. El tamaño de las mismas variará en función de la cantidad de ácido hialurónico que las constituye, así como en función de la cantidad de sal polianiónica que se emplee en la reticulación del sistema, y de la naturaleza del principio activo que incluyen.

La carga superficial de las mismas puede variarse en función de las diferentes proporciones de los polímeros constitutivos de las mismas. Más concretamente, la carga superficial de las nanopartículas varía en magnitud en función de la cantidad de ácido hialurónico que las constituye, y de la sal polianiónica reticulante. Frecuentemente interesa que la carga superficial tome valores positivos, ya que las superficies biológicas del organismo, y particularmente las mucosas, se encuentran cargadas negativamente. Por tanto, la carga positiva

de las nanopartículas favorece su interacción con las mismas y, como consecuencia, se verá favorecido el que las macromoléculas asociadas al sistema nanoparticular actúen sobre los tejidos diana.

5 La cantidad de ácido hialurónico que se incluye en la formación de estas nanopartículas, por otra parte, se espera que module la liberación de las macromoléculas incorporadas, ya que las nanopartículas son vehículos con los que se pretende liberar sustancias activas a los organismos humano o animal de manera controlada o retardada.

10 A continuación, para una mayor comprensión de las características y ventajas de la presente invención, se hará referencia a una serie de ejemplos que de forma explicativa completan la descripción anterior, sin suponer en modo alguno que ésta se vea limitada a los mismos.

EJEMPLOS

Durante la exposición de los siguientes ejemplos se emplearán una serie de abreviaturas:

15 HANa = Sal sódica del ácido hialurónico.

CS = Quitosano.

TPP = Tripolifosfato sódico.

FITC-BSA = Albúmina marcada con fluoresceína.

CsA = Ciclosporina A.

20 SLF = Fluido lacrimal artificial.

Ejemplo 1

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico en forma de sal sódica, quitosano como polímero catiónico, y tripolifosfato sódico como agente reticulante, según el procedimiento previamente descrito. Se adicionó la disolución de hialuronato y tripolifosfato
25 sódico sobre la disolución de quitosano, bajo agitación magnética, la cual se mantuvo durante media hora, permitiendo la completa evolución del sistema hacia una forma nanoparticular estable. Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta) y se calculó el rendimiento de producción (el cual se expresa en porcentaje, y tiene en cuenta el peso de las nanopartículas respecto al peso de los polímeros incorporados). En
30 la tabla 1 y Figuras 1,2,3 se muestran los valores que toman los parámetros citados en función de la proporción de HA-Na, Cs y TPP.

Tabla 1:

HA-Na/CS/TPP (p/p)	Diámetro medio (nm)	Potencial ζ (+mV)	Rendimiento de producción
1/1/0,05	769±36	+36.09±0.99	43±0,5
1/1/0,1	696±129	+34.50±0.28	53±3
1/1/0,15	585±9	+32.90±0.42	64±3
1/1/0,2	782±36	+31.90±0.42	75±1
1/2/0,1	550±42	+34.95±1.14	38±4
1/2/0,2	509±48	+32.63±0.68	55±1
1/2/0,3	584±26	+32.60±0.52	87±8
1/2/0,4	576±100	+31.66±0.78	82±14
1/3/0,15	539±52	+38.16±0.57	19±2
1/3/0,33	442±53	+32.63±0.71	40±3
1/3/0,5	420±16	+36.76±0.84	58±5
1/3/0,66	379±34	+35.33±1.93	72±3
1/10/0,5	634±55	+46.11±1.69	6±2
1/10/1	396±39	+44.78±1.55	15±1
1/10/1,5	312±29	+42.05±1.42	21±6
1/10/2	290±24	+41.59±2.22	34±12

Ejemplo 2

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico en forma de sal sódica, quitosano como polímero catiónico, y tripolifosfato sódico como agente reticulante, según el procedimiento previamente descrito. Se procedió a la incorporación de una macromolécula hidrofílica en su composición, seleccionando para tal fin FITC-BSA. Se trata de una macromolécula cargada negativamente en ambas disoluciones debido al pH de las mismas (3 en el caso de la disolución de quitosano, y entre 8-8.5 en el caso de las disoluciones de hialuronato

y tripolifosfato), por lo que se incorporó junto al ácido hialurónico para evitar la aparición de interferencias en la formación de las partículas.

Se estableció una carga teórica de un 30% respecto al peso de los polímeros, y una vez preparadas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando la proteína libre mediante espectroscopia visible, con $\lambda=494\text{nm}$). También se midió su diámetro medio. El rendimiento de producción fue determinado teniendo en cuenta el peso de los polímeros y de la proteína incorporada. Teniendo en cuenta éste último dato, fue posible determinar la capacidad de carga real de las partículas.

10 **Tabla 2:**

HANa/CS/TPP (p/p)	Diámetro medio (nm)	Eficacia de encapsulación FITC-BSA (%)	Rendimiento de producción (%)	Carga en FITC- BSA (%)
1/2/0,4	745±58	99.75±0.06	71±2	33
1/3/0,5	518±30	99.79±0.03	70±3	34
1/10/1,5	321±24	99.10±0.04	36±4	63

Ejemplo 3

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico en forma de sal sódica, quitosano como polímero catiónico, y tripolifosfato sódico como agente reticulante, según el procedimiento previamente descrito. Se procedió a la incorporación de una macromolécula hidrofóbica, tomando para ello el polipéptido ciclosporina A, agente inmunomodulador prácticamente insoluble en agua, sobre todo a temperaturas moderadas. El procedimiento de elaboración es el ya descrito en la presente invención, con una modificación, ya que la macromolécula es disuelta previamente en una solución acetonitrilo/agua al 50% (V/V), bajo una concentración de 10mg/mL. Posteriormente, un pequeño volumen de esta disolución, en torno a 200µL, es añadido a la solución de quitosano, e inmediatamente después se adiciona la disolución que contiene la sal de ácido hialurónico y el agente reticulante. La encapsulación del fármaco tiene lugar en forma de nanocristales, lo cual justifica que el proceso de adición de la segunda disolución sea rápido evitando que la macromolécula precipite y facilitando que se incorpore a las nanopartículas.

Se establece una carga teórica de CsA del 25% respecto al peso de los polímeros, y una vez preparadas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando el polipéptido libre mediante espectroscopia ultravioleta, con $\lambda=200\text{nm}$). También se midió su diámetro medio. El rendimiento de producción fue determinado teniendo en cuenta el peso de los polímeros y del polipéptido incorporado. Teniendo en cuenta éste último dato, fue posible determinar la capacidad de carga real de las partículas.

Tabla 3

HANa/CS/TPP (p/p)	Diámetro medio (nm)	Eficacia de encapsulación (%)	Rendimiento de producción (%)	Capacidad de carga (%)
1/2/0,4	658±43	99.68±0.27	83±5	24
1/3/0,5	536±88	99.66±0.25	74±6	27
1/10/1,5	515±88	98.93±0.52	54±5	37

10

Ejemplo 4

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico en forma de sal sódica, quitosano como polímero catiónico, y tripolifosfato sódico como agente reticulante, según el procedimiento previamente descrito. Se realizaron medidas de tamaño de partícula y carga superficial, durante un mes, con el fin de obtener información acerca de la evolución del sistema con el tiempo. Para ello se seleccionaron distintas formulaciones con diferentes cantidades de ácido hialurónico. Las proporciones teóricas HANa/CS/TPP fueron: 1/2/0.4 (◆), 1/2.5/0.25 (●), 1/3/0.5 (■) 1/3/0.66 (—) y 1/10/1.5 (▲). Los resultados presentados en las figuras 4 y 5 muestran la escasa variabilidad de los parámetros, tamaño y potencial zeta, durante el almacenamiento.

20

Ejemplo 5

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico, quitosano y TPP según la presente invención. Se incorporó una macromolécula hidrofóbica, CsA, de la manera descrita en el

ejemplo 3. Posteriormente, se midió el diámetro de las nanopartículas a lo largo de una semana para comprobar la estabilidad del sistema con el tiempo. También se comprobó que el fármaco se encuentra incorporado en las partículas y no precipitado en forma de nanocristales, ya que no se observó ningún tipo de crecimiento cristalino. La carga teórica de CsA se fijó en un porcentaje del 25% respecto a la masa de las nanopartículas. Las proporciones de los polímeros formadores de las partículas y el agente reticulante, HANa/CS/TPP, fueron 1/2/0.4 (♦) y 1/3/0.5(■).

Ejemplo 6

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico en forma de sal sódica, quitosano como polímero catiónico, y tripolifosfato sódico como agente reticulante, según el procedimiento previamente descrito. Se utilizó una proporción HANa/CS/TPP de 1/2/0.4, y sobre estas nanopartículas se comprobó el efecto que el tipo de agente crioprotector utilizado en el procedimiento de liofilización tiene sobre el tamaño. Asimismo se evaluó la influencia de la concentración de nanopartículas en la suspensión a liofilizar. Tras ensayos preliminares, como agentes crioprotectores fueron seleccionados dos azúcares, glucosa y trehalosa, y su concentración se mantuvo constante, fijándola en un 5% (p/V).

Ejemplo 7

Las nanopartículas desarrolladas por el método de la presente invención, y liofilizadas en presencia de glucosa al 5%(p/V), fueron incubadas en SLF, el cual posee un pH de 7.4 y una elevada concentración de iones. La formulación seleccionada fue la misma que en el ejemplo anterior. Se realizaron medidas del diámetro medio de las partículas durante 24 horas.

Ejemplo 8

Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico en forma de sal sódica, quitosano como polímero catiónico, y tripolifosfato sódico como agente reticulante, según el procedimiento previamente descrito. La formulación desarrollada fue aquella con una composición HANa/CS/TPP: 1/2/0.4, y fue liofilizada durante 48h utilizando como agente crioprotector glucosa al 5%. Posteriormente, se realizó un estudio de mucoadhesión, utilizando para ello SLF y una solución de mucina al 4%.

El ácido hialurónico es un polímero que presenta un comportamiento viscoelástico en forma de gel. En el caso de suspensiones coloidales el comportamiento reológico resulta más complejo; la viscosidad se ve fuertemente influenciada por las propiedades superficiales de las partículas.

- La mucoadhesividad de las nanopartículas fue determinada a partir de las siguientes mezclas, preparadas al 50%: nanopartículas/mucina, nanopartículas/SLF y mucina/SLF. La existencia de sinergismo en cuanto a la primera de las mezclas respecto al sumatorio de las otras dos, observando los valores del módulo elástico (G') y módulo viscoso (G''), es indicativa de
- 5 que el sistema presenta propiedades mucoadhesivas. La fórmula matemática utilizada fue:

$$G'^{(s)} = G'^{(s)}_{\text{Nanopartículas-Mucina4\%}} - (G'^{(s)}_{\text{Nanopartículas-SLF}} + G'^{(s)}_{\text{Mucina4\%-SLF}})$$

Los resultados de módulo elástico y modulo viscoso aparecen en las figuras 10 y 11.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de nanopartículas para la administración de al menos un ingrediente activo, con un diámetro inferior a μm , caracterizado porque comprende las etapas de:
 - 5 a) preparar una disolución acuosa de una sal de ácido hialurónico;
 - b) preparar una disolución acuosa de un polímero catiónico;
 - c) adicionar una sal polianiónica a la disolución de la sal de ácido hialurónico;
 - d) mezclar bajo agitación las disoluciones de las etapas b) y c), obteniéndose espontáneamente las nanopartículas,
- 10 donde el ingrediente activo es disuelto en una de las disoluciones resultantes a), b) o c) o es disuelto en la suspensión de nanopartículas obtenida en la etapa d) para ser adsorbido sobre las nanopartículas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución de la sal de ácido hialurónico se prepara en una concentración de entre 0,50 y 5 mg/mL.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la disolución de polímero catiónico se prepara en una concentración de entre 0,5 y 5 mg/mL.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la sal aniónica es añadida en una concentración de 0,25 y 1,00 mg/mL.
- 20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el ingrediente activo es una macromolécula.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque, en caso de que la macromolécula tenga un carácter lipofílico, dicha macromolécula es disuelta, antes de incorporarla a una de las disoluciones a) o b), en una mezcla de agua y de un disolvente orgánico miscible con agua, de forma que la concentración del disolvente orgánico en la
25 disolución final sea menor de 10 % en peso.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el disolvente orgánico es acetonitrilo.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado
30 porque la sal de ácido hialurónico es la sal sódica.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el polímero catiónico es quitosano.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el polímero catiónico es colágeno o gelatina.
- 5 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la sal polianiónica es tripolifosfato sódico.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado la proporción de ácido hialurónico:polímero catiónico:sal polianiónica en la disolución final está entre 1:0,5:0,1 y 1:10:2.
- 10 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la proporción de ácido hialurónico:polímero catiónico:sal aniónica está entre 1:1:0,15 y 1:10:1.5.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque comprende una etapa adicional e), después de la etapa d), de liofilizar las nanopartículas obtenidas en presencia de cantidades reducidas de azúcares.
- 15 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una etapa adicional f), después de la etapa e), de regenerar las nanopartículas liofilizadas.
16. Nanopartículas para la administración de un ingrediente activo, obtenibles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 20 17. Nanopartículas para la administración de un ingrediente activo, caracterizadas porque comprenden una sal de ácido hialurónico, un polímero catiónico, una sal polianiónica y un ingrediente activo.
18. Nanopartículas según la reivindicación 17, caracterizadas porque el ingrediente activo es una macromolécula.
- 25 19. Nanopartículas cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18, caracterizadas porque la sal de ácido hialurónico es la sal sódica.
20. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizadas porque el polímero catiónico es quitosano.
21. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizadas porque el polímero catiónico es colágeno o gelatina.
- 30

22. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, caracterizadas porque la sal polianiónica es tripolifosfato sódico.

23. Composición farmacéutica o cosmética caracterizada porque comprende nanopartículas según las reivindicaciones 16 a 22.

5 24. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 en la preparación de una composición farmacéutica para administración sobre mucosas, tópica o parenteral.

1 / 8

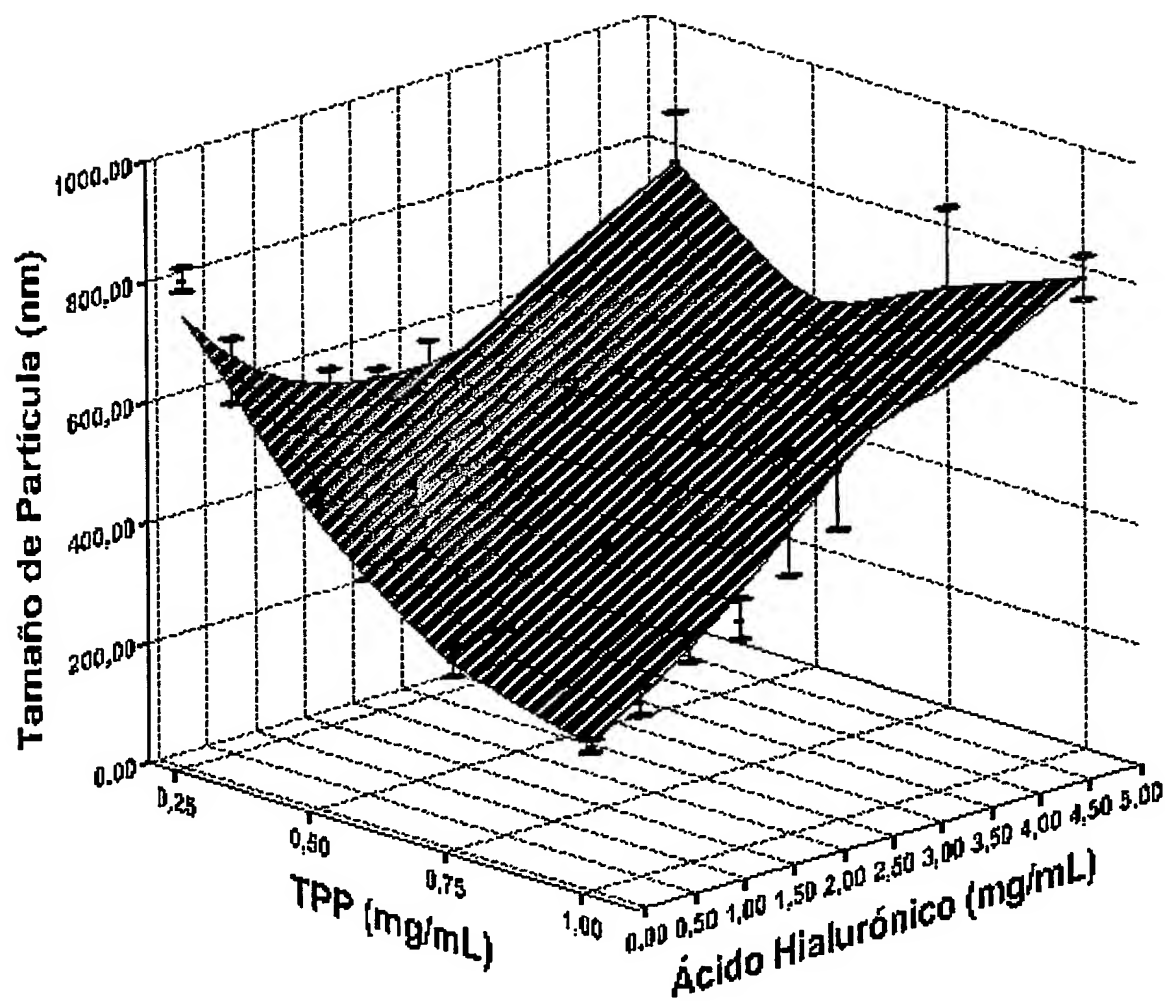


FIG. 1

2 / 8

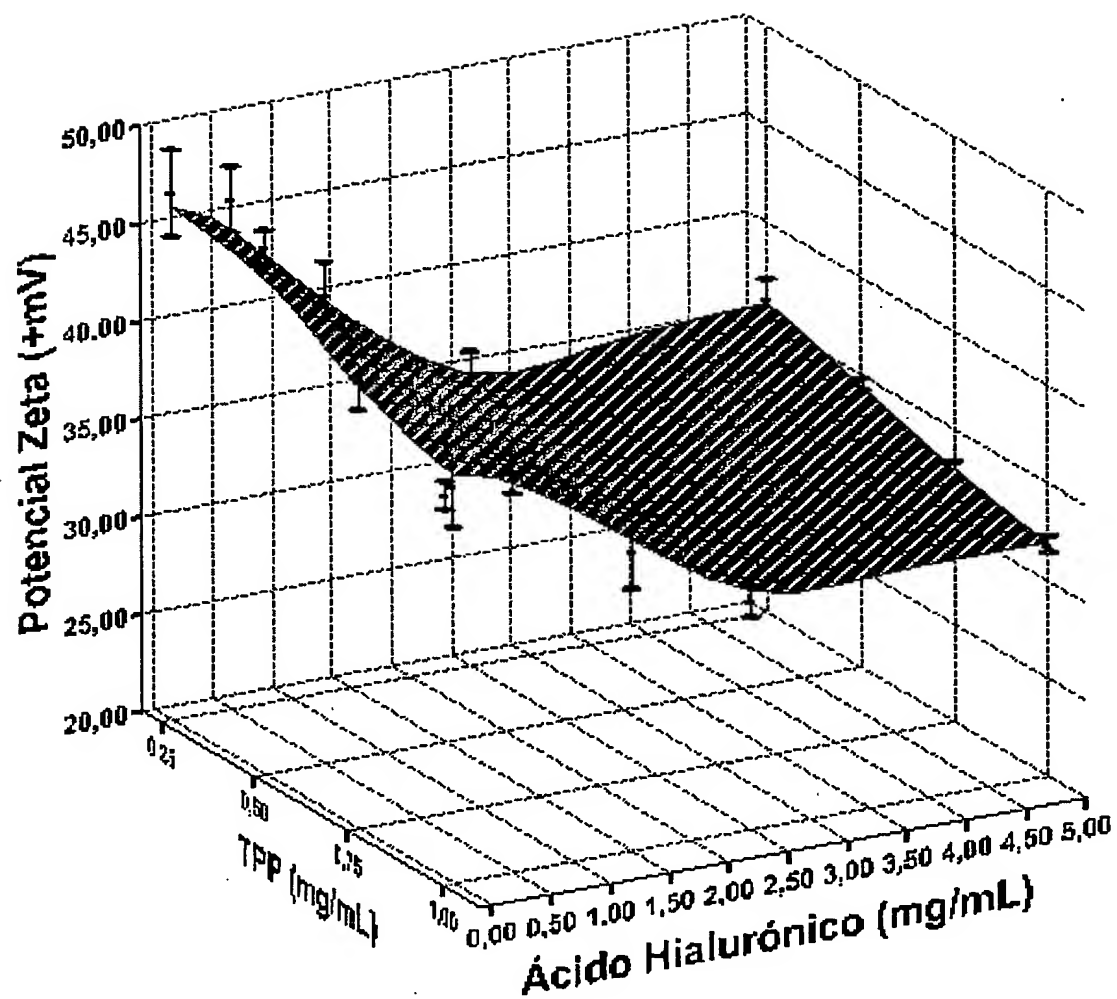


FIG. 2

3 / 8

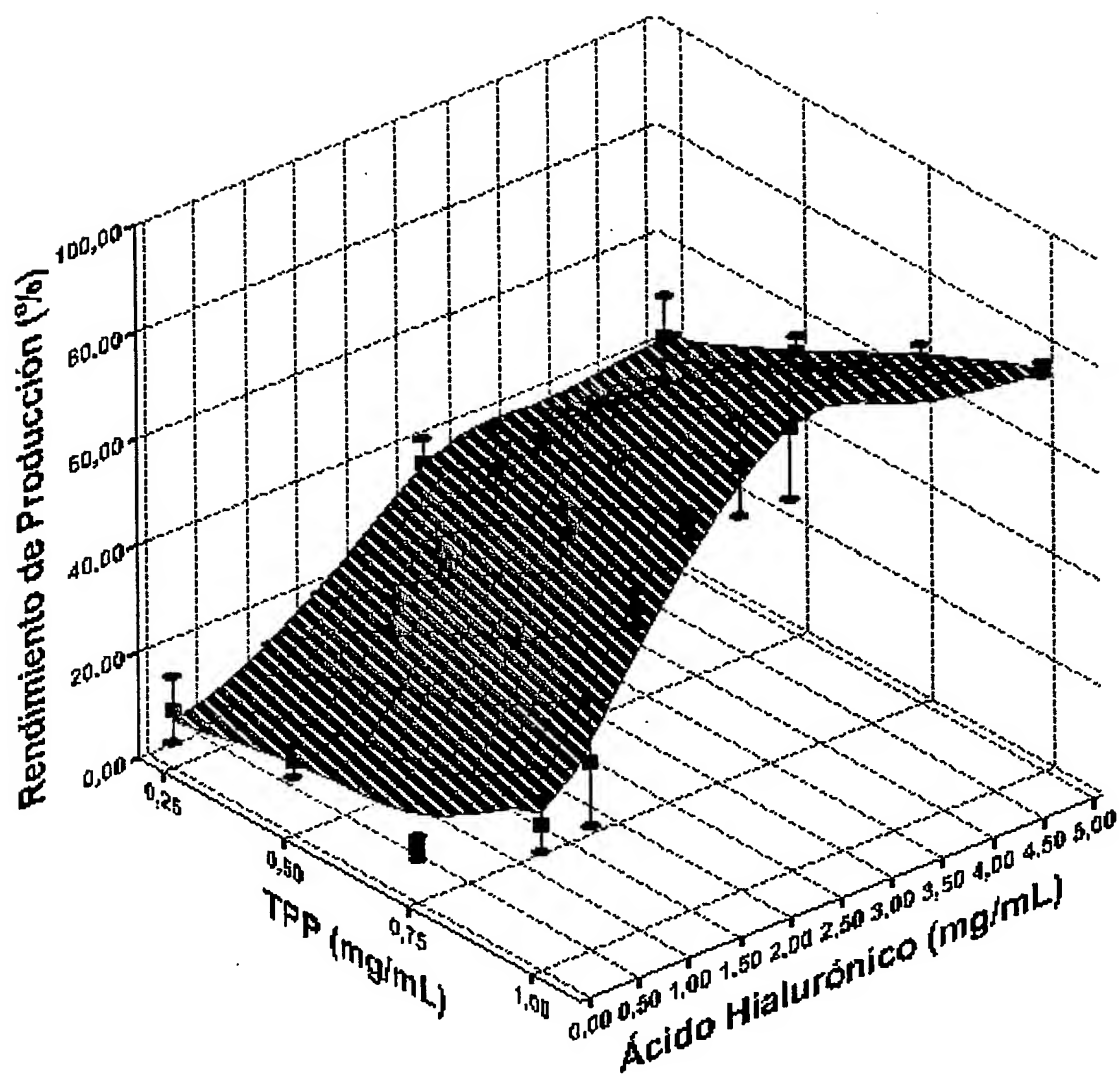
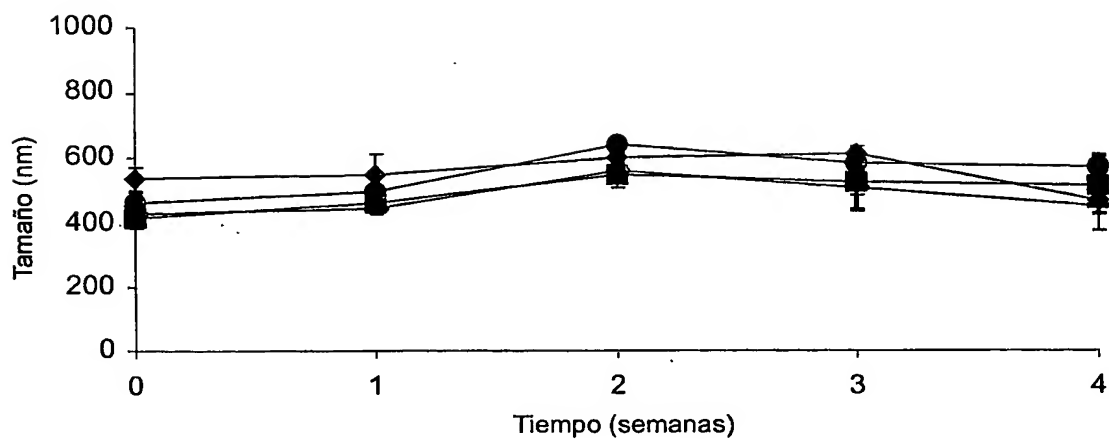
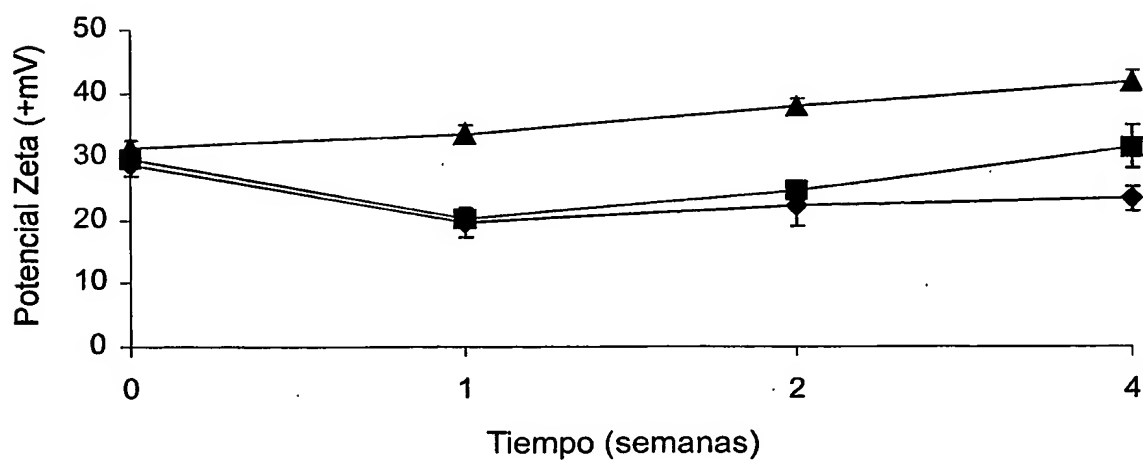
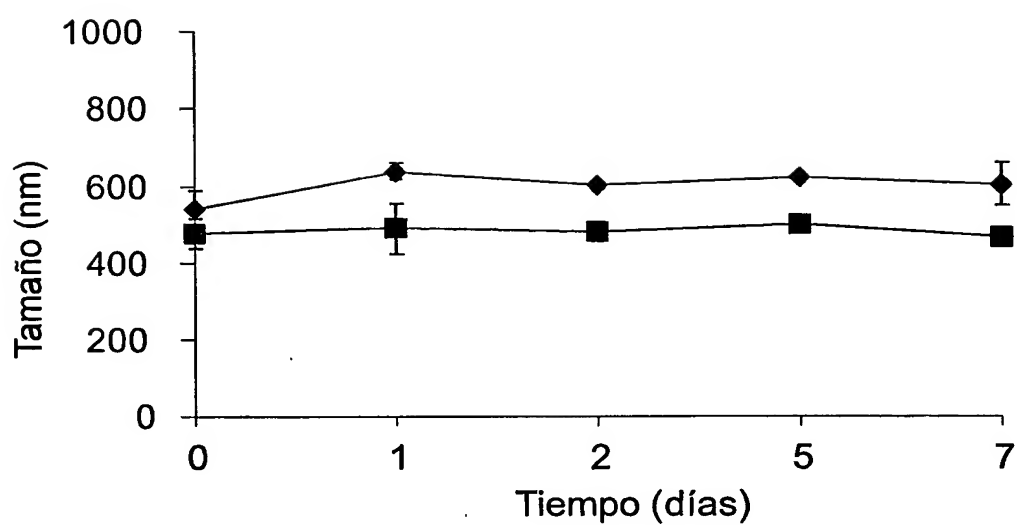


FIG. 3

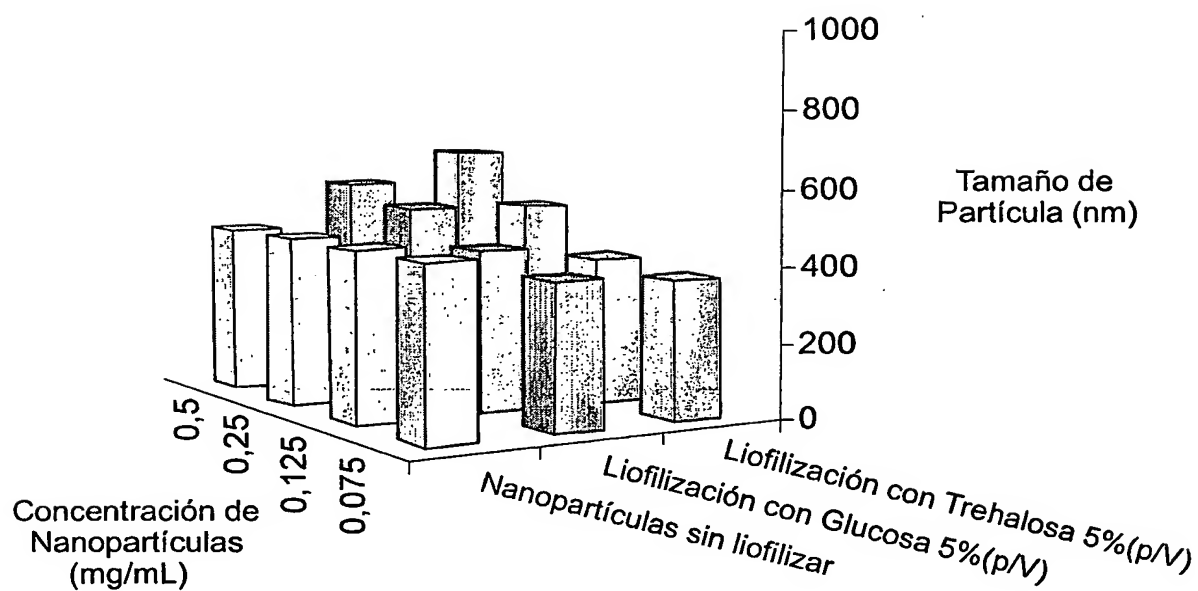
4 / 8

FIG. 4FIG. 5

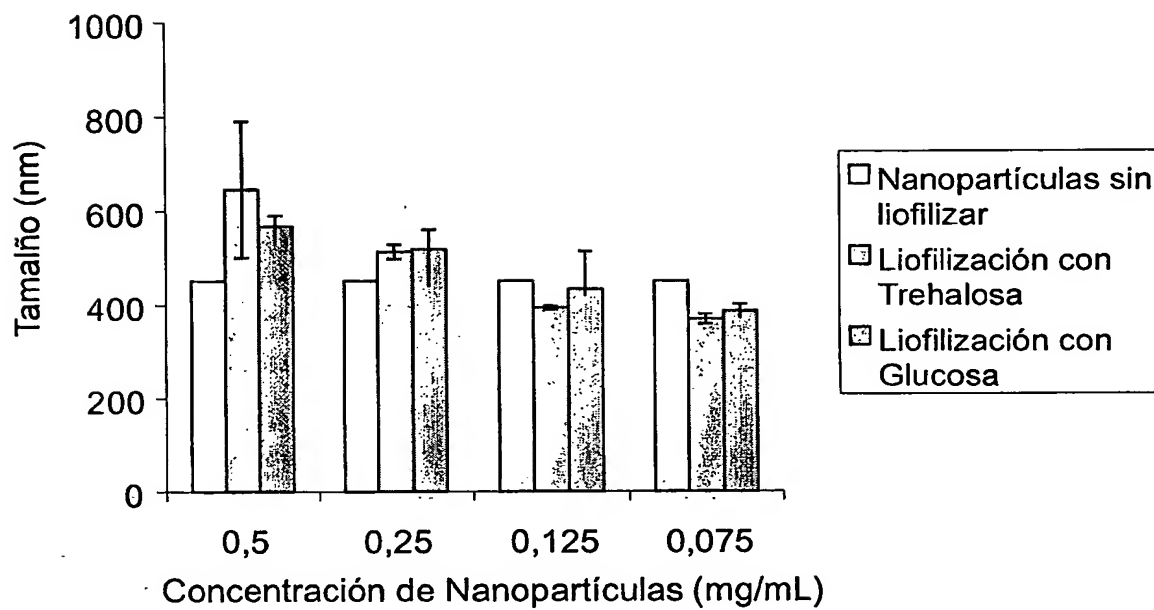
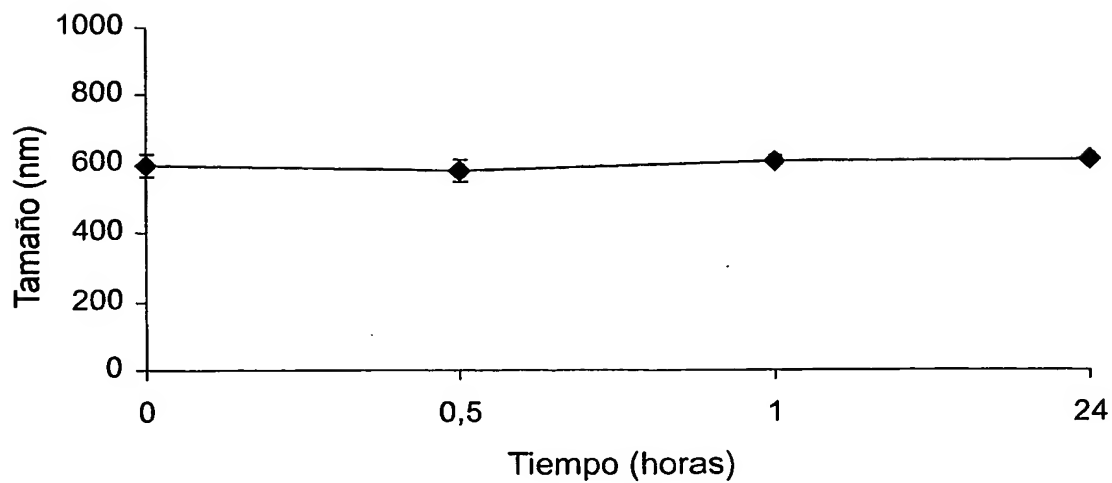
5 / 8

FIG. 6

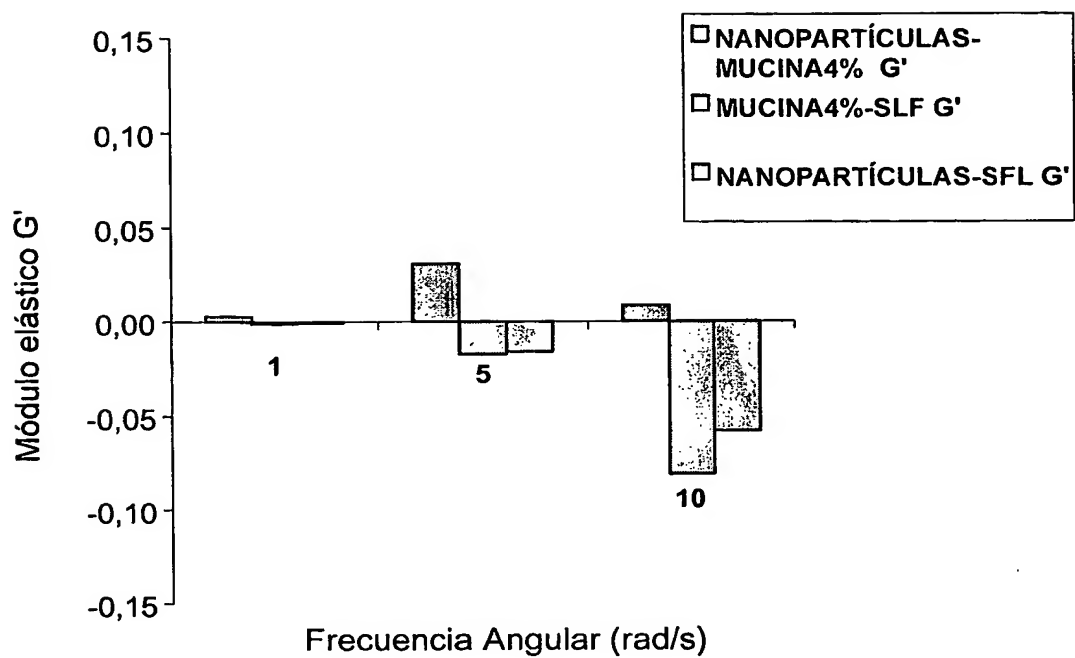
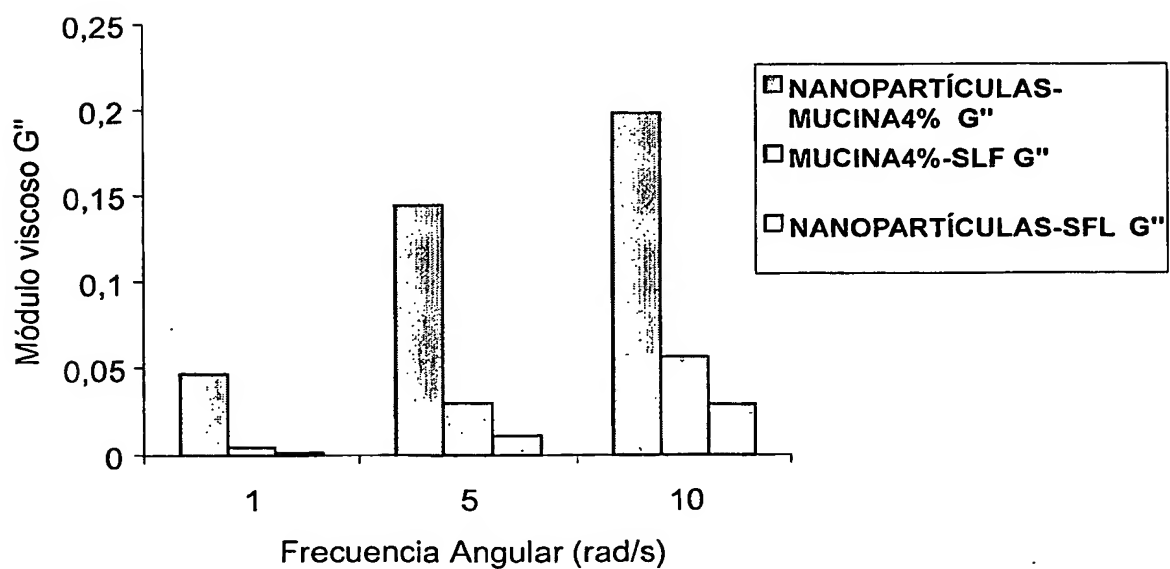
6 / 8

FIG. 7

7 / 8

FIG. 8FIG. 9

8 / 8

FIG. 10FIG. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 A61K9/51, C08B37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 A61K, C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIM, S.T. et al.; Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan, J.Control.Rel. 66, 2000 (2-3), 281-292.	1-24
A	FR 2642329 A (BIOETICA, S.A.) 03.08.1990; whole document.	1-24
A	ES 2098188 A (Univ. Santiago de Compostela) 16.04.1997; whole document.	1-24
A	ES 2114502 A (Univ. Santiago de Compostela) 16.05.1998; whole document.	1-24
P,A	WO2004009060 A (Univ. Santiago de Compostela) 29.01.2004; whole document.	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 September 2004 (09.09.04)

Date of mailing of the international search report

24 September 2004 (24.09.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2642329 AB	03.08.1990	CA 2009065 AC EP 0381543 AB EP 19900400030 AU 4886490 A JP 2229111 A JP 2534921 B AT 89766 T DE 69001683 D DK 381543 T DE 69001683 T ES 2058827 T US 5395620 A US 5622656 A KR 163171 B	31.07.1990 08.08.1990 05.01.1990 09.08.1990 11.09.1990 18.09.1996 15.06.1993 01.07.1993 04.10.1993 02.12.1993 01.11.1994 07.03.1995 22.04.1997 01.12.1998
ES2098188 A B	16.04.1997	NONE	
ES 2114502 AB	16.05.1998	CA 2233501 A WO 9804244 A EP 19960932607 US 2001051189 A US 6649192 B	05.02.1998 05.02.1998 22.10.1996 13.12.2001 18.11.2003
WO2004009060 A	29.01.2004	NONE	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000284

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K9/51, C08B37/08

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K, C08B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CAS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	LIM, S.T. et al.; Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan, J.Control.Rel. 66, 2000 (2-3), 281-292.	1-24
A	FR 2642329 A (BIOETICA, S.A.) 03.08.1990; todo el documento.	1-24
A	ES 2098188 A (Univ. Santiago de Compostela) 16.04.1997; todo el documento.	1-24
A	ES 2114502 A (Univ. Santiago de Compostela) 16.05.1998; todo el documento.	1-24
P,A	WO2004009060 A (Univ. Santiago de Compostela) 29.01.2004; todo el documento.	1-24

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

09 Septiembre 2004 (09.09.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

24 SEP 2004 24. 09. 2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

N. Vera Gutiérrez

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3495544

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000284

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
FR 2642329 AB	03.08.1990	CA 2009065 AC EP 0381543 AB EP 19900400030 AU 4886490 A JP 2229111 A JP 2534921 B AT 89766 T DE 69001683 D DK 381543 T DE 69001683 T ES 2058827 T US 5395620 A US 5622656 A KR 163171 B	31.07.1990 08.08.1990 05.01.1990 09.08.1990 11.09.1990 18.09.1996 15.06.1993 01.07.1993 04.10.1993 02.12.1993 01.11.1994 07.03.1995 22.04.1997 01.12.1998
ES2098188 A B	16.04.1997	NINGUNO	-----
ES 2114502 AB	16.05.1998	CA 2233501 A WO 9804244 A EP 19960932607 US 2001051189 A US 6649192 B	05.02.1998 05.02.1998 22.10.1996 13.12.2001 18.11.2003
WO2004009060 A	29.01.2004	NINGUNO	-----